



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Mayra Troppmair Junqueira
Orientador: Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

BRASÍLIA - DF
JUNHO/2019



MAYRA TROPPEMAIR JUNQUEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES EQUINOS:
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

BRASÍLIA – DF
JUNHO/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Junqueira, Mayra Troppmair

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES EQUINOS: REVISÃO DE
LITERATURA

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília/
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

1. reprodução, 2. equinos, 3.criopreservação, 4.embrião

Cessão de direitos

Nome do Autor: MAYRA TROPPEMAIR JUNQUEIRA

Título da Monografia de Conclusão de Curso: CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

MAYRA TROPPEMAIR JUNQUEIRA

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: JUNQUEIRA, Mayra Troppmair

Título: Criopreservação de Embriões Equinos; Revisão de Literatura

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: Universidade de Brasília

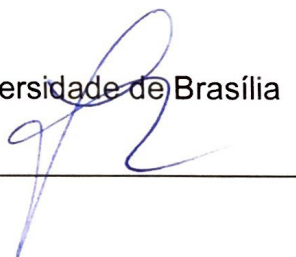
Julgamento APROVADA

Assinatura: 

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento APROVADA

Assinatura: 

Prof. Dr. Rita de Cássia Campebell

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento APROVADA

Assinatura: 

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Preparo para criopreservação.....	15
2.2 Dificuldades.....	16
2.3 Crioprotetores.....	18
2.4 Congelamento Convencional.....	19
2.5 Vitrificação.....	20
3. CONCLUSÕES.....	24
4. RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	26
4.1 Centro Veterinário Gabriela Guenka.....	24
4.2 M. V. Ana Caroline de Araújo Ávila.....	28
5. REFERÊNCIAS.....	30

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha mãe por nunca medir esforços para que eu conseguisse realizar esse sonho. Ela me apoiou, me ajudou, ouviu meus choros, meus medos, minhas inseguranças e nunca me negou carinho e atenção. Ela foi peça fundamental para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Queria agradecer a Deus por me permitir ter essa experiência. Agradecer por ter forças nos momentos difíceis, por ter determinação, por saber lidar e aprender com cada situação e cada empecilho que apareceu, por saber amar ao próximo mesmo quando este não retribuía o mesmo amor.

Queria agradecer a toda a minha família por sempre me educar, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por me permitir sempre ter contato com os animais e por me ensinar a lidar com cada um deles.

Queria agradecer a minha avó Mariza pelo carinho, amor, dedicação e por permitir que eu tivesse contato com a fazenda e com a lida no campo desde criança. Isso me permitiu ver que ser veterinária de grandes animais sempre vai ser meu sonho. Isso me deu forças para nunca desistir.

Aos amigos que criei neste período, muito obrigada por tudo. Vocês me proporcionaram experiências mais que maravilhosas, além de me mostrar a pessoa que eu realmente era. Sou muito grata a cada um, por tudo que fizeram e por fazerem parte da minha vida.

Por último queria agradecer ao meu orientador Rodrigo por me ajudar e por me ensinar os caminhos corretos para me formar e para realmente me tornar uma veterinária. Muito obrigada.

RESUMO

A equinocultura brasileira tem-se expandido ano a ano, com aumento do número de embriões produzidos, porém sem a respectiva disponibilidade de receptoras, sendo este um problema para a produção de equinos. A criopreservação mostra-se como alternativa para manipulação dos embriões excedentes, uma vez que estes são frutos de cruzamentos de animais geneticamente superiores. A técnica de criopreservação mostra-se uma solução, contudo, ainda necessita estudos para torná-la uma realidade no mercado nacional. O processo de congelamento de embriões é realizado com maior frequência em outras espécies domésticas, porém, em equinos, há pouca utilização dessa tecnologia. O objetivo desta técnica é manter o metabolismo celular em estado de quiescência, possibilitando a utilização das células após longos períodos de congelamento. A criopreservação de embriões é influenciada por diversos fatores; entre eles estão a espécie, o estágio e o tamanho embrionário, os crioprotetores, a composição do meio de manutenção, o tempo de equilíbrio e reidratação, as taxas de resfriamento e aquecimento e as condições de cultivo após a criopreservação. O uso de crioprotetores é essencial para que os danos causados no embrião pelo resfriamento sejam mínimos. Hoje em dia existem vários crioprotetores disponíveis comercialmente. Estudos são realizados com o intuito de desenvolver um protocolo eficiente, economicamente viável e que resulte em taxas de prenhez satisfatórias. Atualmente existem duas principais formas de congelamento: a vitrificação e o congelamento convencional. Objetivou-se, com esta revisão de literatura, elucidar como o processo ocorre, pontuar os principais obstáculos e dificuldades da técnica e também algumas soluções, além, de mostrar os diferentes métodos.

Palavras-chave: congelamento de embrião, criopreservação, embriões equinos, reprodução equina.

ABSTRACT

The Brazilian equine production has been expanding year by year. There is an increase of embryos produced; however, there is a deal in concern recipients availability. Cryopreservation has been shown as an alternative for manipulation of spare embryos. The freezing technique is a solution. However, it still needs efforts to figure it out how to make it better. The embryo freezing technique is carried out more in order ruminants than in horses. The objective of this technique is to maintain the cellular metabolism in a state of quiescence, allowing the maintenance of the cells for long periods. The embryo cryopreservation is influenced by several factors, among them are the species, stage and size of embryo, cryoprotectants, the holding composition medium, the equilibrium and rehydration time, cooling and thawed rates. The cryoprotectants using is essential so that the freezing damages can be a bit less. Nowadays, there are several cryoprotectants available. Studies have been developed with the aim of produce an efficient, economically viable protocol that results in satisfactory pregnancy rates. There are currently two main forms of freezing: conventional freezing and vitrification. The objective of this literature is to elucidate how the process occurs, to point out the main obstacles and difficulties of the technique and also some solutions, in addition, and to show the different methods.

Key words: cryopreservation, equine embryos, embryo freezing, equine reproduction.

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura tem se mostrado relevante na economia nacional e mantém-se em expansão. Cada vez mais, pessoas têm procurado o cavalo como forma de lazer. Isso resulta em maior procura por animais e maior demanda dos profissionais da área de reprodução equina. Atualmente, são estimados 5,8 milhões de equinos no Brasil.

O Brasil é o país que mais utiliza a biotécnica de transferência de embrião equino (DE LAVOR et al., 2014). Em contrapartida, o número de receptoras aptas a ingressarem nos programas comerciais não supre o cenário nacional de maneira adequada. Isso acarreta um desequilíbrio entre número de embriões produzidos e quantidade de receptoras disponíveis. Uma alternativa seria o congelamento desses embriões.

A criopreservação tem se tornado de grande necessidade na medicina e na reprodução. Por manter as células e tecidos em estado de quiescência, ela possibilita a manutenção destes por longos períodos. Dessa forma, a transfusão de órgãos, de sangue, e a manutenção de material biológico vivo por longo tempo é possível.

Na Medicina Veterinária, a criopreservação de gametas e embriões possibilita a disseminação de material genético entre territórios e a manutenção desse material por mais tempo. Além do impacto no setor produtivo, a criopreservação é indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção (KRAEMER, 2013). A utilização de sêmen congelado em larga escala é uma evidência das vantagens da criopreservação.

No Brasil, a transferência de embriões equinos é uma das técnicas mais utilizadas para produção de animais geneticamente superiores, porém, a disponibilidade de receptoras não acompanha a produção de embriões, significando um entrave na reprodução equina.

A criopreservação de embriões significa uma alternativa para os embriões produzidos que não teriam receptoras disponíveis, além de manter embriões de animais mais velhos ou que já morreram.

Os entraves dessa técnica tem sido estabelecer um protocolo com taxas aceitáveis de sucesso. No estágio embrionário usado para a transferência de embrião, este encontra-se muito grande, sendo muito afetado pelos danos causados pelo resfriamento.

Objetivou-se, com esta revisão, caracterizar como o processo de criopreservação acontece, mostrar quais seus efeitos no embrião, evidenciar as principais dificuldades e os entraves dessa técnica, apontar algumas soluções disponíveis, além de diferenciar o processo de congelamento convencional e da vitrificação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A necessidade de preservação de material biológico levou inúmeros pesquisadores à busca de técnicas que mantenham células, tecidos e órgãos em estado de uso por longos períodos. A refrigeração e o congelamento tiveram seu uso inicial na China, próximo a 1000A.C., usando gelo para preservação de comida (RAJAN & MATSUMURA, 2018).

Na primeira tentativa para uso da criopreservação em material biológico, foi feito congelamento de sêmen por Spallanzani, em 1776 (RAJAN & MATSUMURA, 2018; OLIVEIRA, 2013). Com essa tentativa ficou claro que a técnica ainda precisava de estudos pois causava danos às células. Em 1942, Polge descobriu que substâncias podiam atuar como protetoras das células, os chamados crioprotetores (RAJAN & MATSUMURA, 2018).

Apesar de inicialmente a criopreservação ser feita sem uso de qualquer crioprotetor, percebeu-se que o congelamento leva a muitos danos celulares, principalmente pela formação de gelo intra e extracelular. Após essa descoberta, foram desenvolvidos muitos crioprotetores, entre eles estão o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o polivinilpirrolidone e os açúcares como a sacarose (OLIVEIRA, 2013). Essas substâncias agem de formas diferentes, tanto no controle eletrolítico intracelular, quanto no controle osmótico dos diluentes extracelulares.

Depois da descoberta dos crioprotetores, percebeu-se outro fator que afeta o sucesso da criopreservação: a velocidade de congelamento. O congelamento lento leva à desidratação excessiva das células (RAJAN & MATSUMURA, 2018; CARVENALE, 2006).

2.1 Preparo para criopreservação

Os embriões são pré-avaliados, a fim de se verificar se têm os requisitos necessários para participar de um programa de criopreservação, e classificados em estágio de desenvolvimento e qualidade. Embriões aptos a entrarem num programa de criopreservação são aqueles em estágio de mórula ou blastocisto inicial (MOYA-ARAUJO et al., 2010), ou seja, os recém-chegados ao útero, medindo 150 até

220µm, porém, em apenas 24 horas, estes embriões já alcançam o tamanho de 300µm, tornando-se blastocisto (SQUIRES, 2016).

Depois os embriões são classificados quanto à sua qualidade, sendo recomendados para manipulação pela *Intenational Embryo Transfere Society* (IETS) aqueles com massa embrionária simétrica e esférica, blastômeros individuais e uniformes. Normalmente, são os colhidos entre os dias 6 e 8 após a ovulação (SANTIN et al, 2009).

Para classificação da qualidade dos embriões observa-se compactação dos blastômeros, regularidade do formato do embrião, que deve ser redondo, tamanho das células e suas variações, textura e cor do citoplasma, presença de vesículas e células extrusas, diâmetro, regularidade da zona pelúcida e presença de fragmentos celulares (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Para que um embrião seja considerado bom, pode ter algumas imperfeições, como zona oval, poucos blastômeros extrusos e ligeira assimetria, porém, não pode apresentar degeneração. SANTIN et al. (2009) também descrevem que os defeitos dos embriões devem ser mínimos, observando o percentual de células extrusadas no espaço perivitelínico, a zona pelúcida deve manter-se íntegra, lisa e sem concavidades.

2.2 Dificuldades

Os embriões são coletados, em programas comerciais de reprodução, em estágio de blastocisto. Quando estão em estágio de blastocisto, a blastocela já apresenta um tamanho considerável, além de haver muita atividade mitótica (SANCHEZ et al., 2017). Estas características têm representado um empecilho para estabelecimento do protocolo ideal de criopreservação de embriões.

Outro fato é que durante o congelamento, são formados grandes cristais de gelo intracelular, que danificam a zona pelúcida e a cápsula do embrião, além de haver aumento da concentração de solutos no meio intracelular, que gera desidratação das células (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Além dos danos já conhecidos nos embriões de outras espécies, a presença da cápsula no embrião equino significa mais uma estrutura que quando lesada, leva à morte embrionária (GEARHART, 2009). Localizada entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto, a cápsula embrionária equina tem a função de filtração de substâncias durante a clivagem (CAIXETA et al., 2008; DALCIN & LUCCI, 2010).

Mesmo fina, esta cápsula apresenta-se bastante resistente, funcionando de forma protetora durante a migração do embrião dentro do útero (CAIXETA et al., 2008). A cápsula é uma camada acelular de mucina glicoproteica, sendo resistente às soluções químicas e enzimáticas e aos traumas mecânicos (DALCIN e LUCCI, 2010).

A cápsula embrionária e a zona pelúcida têm a função de controlar os patógenos e a difusão de nutrientes do embrião, sendo assim, acabam prejudicando a difusão de crioprotetores, por essas funções, danos na cápsula ou na zona pelúcida podem prejudicar de forma permanente o desenvolvimento embrionário (NICACIO, 2008). Embriões menores que 300µm têm resultado em taxas de recuperação embrionárias maiores que embriões com diâmetro maior que 300µm (SQUIRES, 2016). Já ficou evidente que embriões maiores que 300µm, em estágio de blastocisto, possuem maior taxa de morte celular após criopreservação, principalmente em protocolos de vitrificação (SANCHEZ et al., 2017).

SANCHEZ et al. (2017) discorrem sobre a punção da blastocle antes da criopreservação com a finalidade de desidratar o embrião e diminuir a quantidade de crioprotetor utilizada, assim diminuindo tanto os danos osmóticos, quanto os danos físicos. Essa seria uma solução para a utilização de embriões maiores que 300µm em programas de congelamento.

O desafio das técnicas de congelamento tem sido driblar os danos celulares para que ao final do descongelamento o embrião esteja apto para desenvolver-se.

2.3 Crioprotetores

Crioprotetor é qualquer substância que, quando adicionada ao material biológico antes do congelamento, proteja-o contra os danos causados pelas baixas temperaturas (RAJAN & MATSUMURA, 2018; OLIVEIRA, 2013), cuja ação dessas substâncias pode ser diferenciada em duas formas: os intracelulares e os extracelulares.

Apesar de inicialmente a criopreservação ser feita sem uso de qualquer crioprotetor, percebeu-se que o congelamento leva a muitos danos celulares, principalmente pela formação de gelo intra e extracelular (RAJAN & MATSUMURA, 2018; OBERSTEINS et al., 2001). Os crioprotetores agem nas membranas biológicas dos blastômeros.(SANTIN et al., 2009).

Os crioprotetores de ação intracelular são benéficos ao retraindo o embrião devido à perda de líquidos, consequente da hiperosmolaridade do meio intracelular (SANTIN et al., 2009). Os principais usados são etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol, propanodiol e metanol. O crioprotetor mais utilizado é o glicerol, pois ele reduz a concentração de eletrólitos intracelular durante a desidratação, assim reduzindo a toxicidade osmótica (RAJAN & MATSUMURA, 2018; OLIVEIRA, 2013).

Os crioprotetores extracelulares agem osmoticamente, controlando a saída de líquidos e evitando os grandes cristais de gelo, sendo os principais a lactose, a glicose, a sacarose e o manitol. Os açúcares interagem com a parte polar dos fosfolipídeos da membrana, por isso conseguem controlar a entrada e saída de líquido (RAJAN & MATSUMURA, 2018).

Acredita-se que a utilização de ambos os tipos de crioprotetores pode ser benéfica (SANTIN et al., 2009). NICACIO (2008) relata que embriões expostos a crioprotetores encolhem em decorrência da troca de fluidos, até estabelecer-se um equilíbrio entre a hiperosmolaridade extracelular e a maior permeabilidade da membrana.

Também considerado ponto crítico, o descongelamento dos embriões pode levar a danos permanentes na membrana celular. SANTIN et al. (2009) descrevem que, nesse período, a concentração dentro do embrião de crioprotetor é alta. Sendo assim, é necessário a utilizar de solução que atue como tampão osmótico, controlando a entrada de água. A sacarose é comumente utilizada nas soluções de descongelamento, uma vez que age mantendo a concentração no meio extracelular, controlando a entrada de água e saída de crioprotetor (SANTIN et al., 2009; RAJAN & MATSUMURA, 2018).

O desafio das técnicas de congelamento tem sido driblar os danos celulares para que, ao final do descongelamento, o embrião esteja apto para desenvolver-se. A técnica convencional de congelamento de embriões, apesar de permitir a desidratação do embrião sem a formação de cristais de gelo intracelular, é cara, precisa de equipamento específico (OBERSTEIN et al., 2001)

. Já a vitrificação não precisa de equipamento específico, é simples e rápida, porém o embrião fica suscetível a toxicidade de altas concentrações de crioprotetores (MOYA-ARAUJO et al., 2010).

2.4 Congelamento Convencional

O congelamento convencional possibilita que o embrião troque água com o ambiente de forma mais fácil e tem menos efeito de crioprotetores (OBERSTEIN et al., 2001; MOUSSA et al., 2005)

. Durante o processo, forma-se o gelo extracelular, levando a um gradiente de água e soluto diferente entre o meio intra e o extracelular, resultando na saída de água de dentro da célula (RAJAN & MATSUMURA, 2018). Dessa forma, evita-se a formação de cristais de gelo intracelular. Essa técnica foi usada inicialmente para criopreservação de material genético, porém, resulta em baixas taxas de sucesso.

Um exemplo de protocolo descrito por SQUIRES (2016) seria o uso de glicerol como crioprotetor e envasamento do embrião em palheta de 0,5ml. A taxa de resfriamento é 4°C/minuto até alcançar -6°C. Uma vez nesta temperatura, a palheta é fechada com objeto metálico, ou de algodão, já resfriado em nitrogênio líquido. Esse procedimento, chamado de *seeding*, tem o objetivo de evitar que haja troca de calor entre os embriões e o meio (DALCIN & LUCCI, 2010). Depois a palheta é mantida em uma taxa de resfriamento de 0,3°C/minuto até alcançar -30°C. Neste ponto, a água de fora da célula congela e há aumento na concentração de solutos. Essa diferença de gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular acaba desidratando o embrião até um ponto em que a concentração dos meios se iguala e não há mais troca de líquidos (DALCIN & LUCCI, 2010; OBERSTEIN et al., 2001). Só então, as palhetas são colocadas em nitrogênio líquido.

São desvantagens na técnica de congelamento lento: o tempo gasto (por volta de duas horas) e a necessidade de maquinário específico (SQUIRES, 2016). Além disso, a desidratação em excesso acaba levando a uma alta concentração de solutos e crioprotetores intracelular, elevando os danos tóxicos dos crioprotetores (RAJAN & MATSUMURA, 2018). Essa técnica resulta em aumento dos custos tanto para os veterinários, como para os proprietários, embora a indústria bovina-a utilize bastante (DALCIN & LUCCI, 2010).

2.5 Vitrificação

A palavra vitrificação deriva do latim *vitreum*, que significa vidro e se refere ao processo em que uma substância líquida passa para um estado de vidro

rapidamente (RAJAN & MATSUMURA, 2018; DALCIN & LUCCHI, 2010). A vitrificação de embriões é uma técnica caracterizada como ultrarrápida, uma vez que os meios de criopreservação passam de um estado líquido para vitrificado e amorfo (SANTIN et al., 2009), com ocorrência mínima de formação de cristais. Por conta da rapidez do congelamento, a água intracelular passa de líquida para um estado vítreo, sem transformar-se em gelo (RAJAN & MATSUMURA, 2018).

Trata-se de um processo de congelamento de embriões utilizando altas concentrações de crioprotetores para congelar rapidamente o embrião, sem que haja formação de cristais de gelo (GEARHART, 2009). HAFEZ & HAFEZ (2004) mencionam que embriões podem ser criopreservados por longos períodos se suportarem temperaturas nas quais não há nenhuma atividade celular ou fisiológica.

Para incubar os embriões podem-se usar diferentes técnicas, entre elas estão convencional em palhetas de 0,25ml, método OPS (*Open Pulled Straw*), método de grade de microscopia eletrônica de transmissão, cryoloops, método de micropipeta de vidro, método de superfície sólida de vitrificação, método das microgotas (SANTIN et al., 2009; OBERSTEIN et al., 2001). A maioria dessas técnicas promove o contato direto do embrião com o nitrogênio líquido, o que pode levar à contaminação (GREEN, 2005). A utilização de nitrogênio esterilizado e armazenamento em containers fechados elimina esse risco.

Segundo GREEN (2005), a técnica de envasamento em palhetas de 0,25ml requer elevadas concentrações de crioprotetores para evitar o dano no embrião, causando maior toxicidade. Esta técnica consiste em usar palhetas francesas de 0,25ml, preencher duas colunas com 160µl de solução de sacarose, outras duas de 20µl de solução de vitrificação e 20µl do meio contendo o embrião. Para separar as soluções, são usadas colunas de ar de aproximadamente um centímetro cada uma. Esta distribuição é feita de modo que o meio com embrião fica entre as colunas. Ao final, as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido. SANTIN et al. (2009) relata que a taxa de resfriamento chega a 2.000°C por segundo.

A técnica de OPS é uma adaptação das palhetas francesas. O objetivo deste método é diminuir o diâmetro interno e externo da palheta, reduzindo, assim, o volume de crioprotetor e a espessura da parede da palheta (OBERSTEIN et al., 2001; GREEN, 2005). Menores quantidades de crioprotetores causam menores prejuízos ao embrião. Nessa técnica, os tampões de algodão são retirados e as palhetas, amolecidas na parte central por aquecimento em placa quente (SANTIN et

al., 2009) e, para alcançar o diâmetro desejado, as extremidades são puxadas (GREEN, 2005; MOUSSA et al., 2005). O ar é utilizado para esfriar as palhetas, que são, então, cortadas na porção mais estreita. O efeito de capilaridade faz com que 1 a 2µL do meio de vitrificação contendo o embrião entre na parte mais estreita da palheta (GREEN, 2005; OBERSTEIN et al., 2001; MOUSSA et al. 2005). Esta parte é imersa em nitrogênio líquido, solidificando a coluna e impedindo a dispersão de líquido (SANTIN et al., 2009; GREEN, 2005). Uma desvantagem é o embrião estar em contato direto com o nitrogênio líquido, porém, selar a palhetas com algodão e álcool polivinílico pode ser uma alternativa (GREEN, 2005). A diminuição da espessura da parede aumenta a taxa de resfriamento para 20.000°C/minuto (SANTIN et al., 2009).

A vitrificação por grades de microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica alternativa às já citadas e utiliza pequenos volumes de crioprotetor em grades de microscopia eletrônica de transmissão, que são mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido (GREEN, 2005). Nesse método, os embriões são colocados em solução crioprotetora de 5,5 M de EG e 1M de sacarose, com auxílio de uma pipeta (GREEN, 2005; SANTIN et al., 2009), e os embriões ficam expostos a 1µl de crioprotetor por 20 a 30 segundos. SANTIN et al. (2009) relatam que um filtro de papel no interior das grades pode ser usado para diminuir o volume da solução crioprotetora. Neste procedimento são atingidas taxas de resfriamento de 20.000°C/ minuto (GREEN, 2005).

O método de cryoloop utiliza um laço de náilon de 0,5 mm de diâmetro e 20µm de espessura, sobreposto em cilindro de aço inoxidável sobreposto a via de acesso ao nitrogênio líquido (GREEN, 2005; OBERSTEIN et al., 2001). O cryoloop é mergulhado na segunda solução crioprotetora enquanto o embrião permanece na primeira solução de vitrificação, a fim de formar uma fina película de meio sobre o náilon (GREEN, 2005). Logo após, 1 a 2µl de meio contendo o embrião é colocado sobre a película formada no náilon, utilizando uma pipeta, e imediatamente é imerso no nitrogênio. SANTIN et al. (2009) afirmam que o tempo entre o contato do embrião com o laço e sua imersão no nitrogênio não deve exceder 45 segundos. O pequeno recipiente utilizado no cryoloop reduz as microinjúrias, por favorecer a rápida troca de calor durante o resfriamento (OBERSTEIN et al., 2001).

Como forma de melhorar a vitrificação por OPS, foi desenvolvida a vitrificação por micropipetas de vidro (GMP). O objetivo é que as palhetas não

flutuem no nitrogênio líquido e que tenham diâmetros interno e externo menores (GREEN, 2005). Para isso, a micropipeta é produzida pelo estiramento de capilares de vidro, utilizando a mesma técnica do OPS. Após comparação dos resultados da vitrificação pelo método OPS e pelo método GMP, Green (2005) não encontrou diferença estatística. Já SANTIN et al. (2009) relatam diferença estatística de taxa de expansão embrionária, sendo maior na técnica de GMP. Um empecilho para utilização dessa técnica é a fragilidade da micropipeta, ocorrendo rachaduras na extremidade mais fina.

A vitrificação é um processo de congelamento ultrarrápido que tem gerado resultados satisfatórios na criopreservação de embriões equinos. Porém, ainda não há um protocolo padronizado para uso desta técnica em escala comercial. A criopreservação é uma técnica que promete auxiliar e incrementar as técnicas de reprodução assistida, sendo solução para quando não houver disponibilidade de receptoras e para armazenamento de material genético. Mais estudos devem ser realizados para desenvolver um protocolo padrão e elucidar formas de driblar os danos causados pelo frio e pela toxicidade dos crioprotetores.

3. CONCLUSÕES

A criopreservação é uma técnica que promete auxiliar e incrementar as técnicas de reprodução assistida, uma vez que é uma solução para quando não houver disponibilidade de receptoras e para armazenamento de material genético. Apesar das várias vantagens da técnica, como custo mais acessível e melhores resultados, ainda necessita-se de estudos para padronizar um protocolo para uso comercial. Os crioprotetores apresentam-se como parte essencial do processo, uma vez que auxiliam na troca de líquidos entre o embrião e o meio, mas sua toxicidade ainda deve ser estudada. A punção da blastocela tem sido utilizada para diminuir a quantidade de crioprotetor utilizada, porém, o dano à zona pelúcida e à capsula pode levar à morte embrionária.

4. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Este estágio foi realizado em duas etapas. A primeira parte foi desenvolvida no Centro Veterinário Gabriela Guenka (CVGG), em Planaltina – DF, do dia 11 de março ao dia 10 de maio, totalizando 360 horas. A segunda fase ocorreu com a médica veterinária Ana Caroline de Araújo Ávila, do dia 13 de maio ao dia 21 de junho, somando 280 horas.

As atividades realizadas no CVGG consistiam, principalmente, em avaliações do aparelho locomotor de equinos, com foco em animais com queda de desempenho esportivo e apresentando claudicações. A médica veterinária (MV) responsável era Gabriela Soares de Moura Guenka.

A clínica era composta de seis baias normais e uma baia para isolamento de animais com doenças infecciosas, um brete de contenção especial para equinos, raio-x, ultrassom, aparelho de ozonioterapia e de laserterapia classe IV. A prática diária começava com exame físico dos animais internados e rotina de curativos. Depois eram atendidos animais na região do Distrito Federal e alguns em Unaí-MG e Paracatu-MG.

A abordagem clínica compunha-se de avaliação do animal em estação, em movimento de passo e de trote, e na palpação das principais estruturas anatômicas. A avaliação dinâmica era feita com o animal em linha reta e em círculo, tanto no passo como no trote, alguns casos no galope. O percurso em oito era feito com o animal a passo.

Após essa primeira fase, eram realizados testes de flexão dos membros. Com uma suspeita clínica mais focada, eram feitos bloqueios anestésicos e testes auxiliares de diagnóstico, como ultrassonografia e radiografia.

As demais atividades realizadas no CVGG eram rotina de curativos, medicações, exames clínicos dos animais internados e atendimentos clínicos gerais. Periodicamente eram realizados estudos e apresentações sobre assuntos relevantes para a área e dissecações de membros equinos para aprimorar o aprendizado.

O trabalho com a Médica Veterinária (MV) Ana Caroline de Araújo Ávila era feito em alguns haras localizados na região do Distrito Federal, principalmente nos Haras Jacurutu, em Brazlândia, e Haras Terra Vermelha, em Planaltina. Com foco

na área de reprodução equina, eram realizadas avaliações ultrassonográficas de éguas doadoras e receptoras, visando à sincronização para transferência de embrião e prenhes.

Com o decorrer do estágio, a palpação retal e a realização do exame ultrassonográfico foram ficando mais fáceis; assim, muitas vezes a monitoração folicular era realizada em conjunto com a MV, sendo apenas a transferência de embrião realizada exclusivamente pela MV responsável.

4.1 Centro Veterinário Gabriela Guenka

O exame clínico detalhado do aparelho locomotor dos equinos é de fundamental importância para um correto diagnóstico das claudicações. Antes de qualquer exame eram coletados dados como nome do animal e do proprietário, raça, esporte e intensidade esportiva. Depois de realizado exame clínico completo, era feito o exame ortopédico, que consistia em avaliação do animal em estação e em movimento.

A abordagem clínica compunha-se de avaliação do animal em estação, em movimento de passo e de trote, e na palpação das principais estruturas anatômicas. A avaliação dinâmica era feita com o animal em linha reta e em círculo, tanto no passo como no trote, alguns casos no galope. O percurso em oito era feito com o animal a passo.

A observação estática do animal, com ele parado, era realizada para avaliação das características anatômicas dos animais, como tamanho, angulação, alterações de aprumos ou outros (Figura 1).

Durante a avaliação do animal ao passo e ao trote, eram observadas a característica e a amplitude do movimento das articulações. Iniciava-se com o animal a passo em linha reta, depois em círculo e em oito. Após esta etapa, o animal era avaliado ao trote em linha reta e em círculo para os dois lados.



Figura 1 - Exemplo de avaliação de casco. A) Vista de frente e B) Vista lateral

Após, eram realizados os testes de flexão dos membros. No membro torácico (MT), a ordem de flexão das articulações era sempre de distal para proximal, seguindo-se, assim, primeiro articulação interfalangeana proximal e interfalangeana distal, depois articulação metacarpofalangeana, articulação do carpo, articulação umeroradioulnar e articulação escapuloumeral. Já no membro pélvico a professora Gabriela preferia seguir a ordem articulação femurotibiopatelar, articulação interfalangeana distal e proximal, articulação coxo-femoral e articulação do tarso. Esta ordem era seguida, pois, pela experiência da professora, ao flexionar o joelho (articulação femurotibiopatelar), acaba por flexionar também a articulação coxo-femoral, e ao flexionar a articulação do casco (articulação interfalangeana distal), também flexiona o jarrete (articulação do tarso).

Quando identificada a origem da claudicação, era feito bloqueio anestésico da região, usando lidocaína, com o intuito de confirmar a suspeita, para se realizar os exames complementares, constituídos majoritariamente por radiografia e ultrassonografia. Estas duas modalidades diagnósticas trabalham complementando-se, uma vez que a radiografia avalia as estruturas ósseas e a ultrassonografia examina os tecidos moles, como músculos e tendões.

As terapias utilizadas compunham-se em associação de terapias convencionais, farmacológicas e terapias complementares. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (flunixinina meglumina, fenilbutazona, dipirona e meloxicam), analgésicos (lidocaína) e antibióticos (ceftiofur, penicilina gentamicina) estavam entre as classes farmacológicas mais usadas. A infiltração e a lavagem articular são

formas mais diretas de tratamento das lesões, pois atingem maiores concentração do fármaco no local da lesão. Para realização deste processo eram feitas tricotomia local e assepsia; após, era colocado ácido hialurônico e algum antiinflamatório, de acordo com a escolha da médica veterinária Gabriela.

Atualmente, tem-se descoberto novas terapias que complementam e intensificam o processo de cura. Entre essas terapias, as mais utilizadas no estágio no CVGG são a ozonioterapia e a laserterapia classe IV. Durante o estágio, foi realizada em um cavalo a auto-hemoterapia maior (Figura 2) para tratamento de doença de pele. Essa técnica consiste na ozonização do sangue do animal e depois, reimplantação no mesmo.



Figura 2 - Exemplo de aparelho usado na ozonioterapia e preparação de auto-hemoterapia maior

Demais atividades realizadas no CVGG foram: rotina de curativos, medicações, exames clínicos dos animais internados, e atendimentos clínicos gerais. O exame físico era composto basicamente por ausculta da frequência cardíaca, da frequência respiratória e da qualidade da motilidade intestinal, por avaliação das mucosas e do tempo de preenchimento capilar, limpeza dos cascos e escovação do animal. Quando indicado, eram feitas a ozonioterapia e a laserterapia, no início acompanhadas pelo residente responsável. Periodicamente eram realizados estudos e apresentações sobre assuntos relevantes para a área e dissecações de membros equinos para aprimorar o aprendizado.

4.2 M.V. Ana Caroline de Araújo Ávila

A reprodução equina é uma área de importância para a economia do mundo do cavalo. Com as técnicas de reprodução assistida, é possível produzir mais potros por estação de monta, permitindo, assim, maior oferta de animais para

comércio. Dentro dessas técnicas, as mais utilizadas no período do estágio foram a transferência de embrião (TE), a inseminação artificial (IA) e a coleta de sêmen do garanhão.

A rotina nos haras iniciava-se com monitoração folicular das doadoras e das receptoras. Para isso, é necessário uma genitália externa com conformações adequadas (Figura 3). Por meio de palpação retal e ultrassonografia, avaliava-se as características do útero, como tonicidade, edema e tamanho, e dos ovários: tamanho, presença de folículos ou corpo lúteo (CL). Esses procedimentos eram feitos utilizando-se troncos de contenção adequados para equinos.

As doadoras que apresentavam edema uterino igual ou maior que três (escala de 0 a 5) e folículo maior que 30 mm eram candidatas à indução da ovulação. A indução da ovulação é feita para melhor utilização do sêmen equino, uma vez que este não se encontra sempre disponível, apresentando-se em quantidades limitadas. Caso haja poucas éguas e vários garanhões, com possibilidade de usá-los várias vezes, não seria necessária a indução da ovulação. A indução era feita com histerilina, e a égua ovulava 36 a 48 horas após a aplicação.

A inseminação artificial (IA) das éguas era feita, preferencialmente, um dia após a indução, porém, em alguns casos não era possível, sendo a égua inseminada no mesmo dia. O sêmen do garanhão fica vivo 48 horas após a coleta, assim, tinha-se segurança de que, quando a égua ovulasse, haveria espermatozóides disponíveis para fecundação.

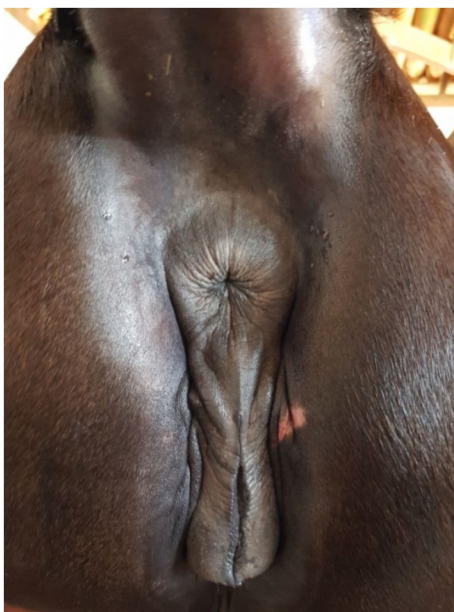


Figura 3 - Exemplo de trato reprodutor feminino ideal

Quando as éguas eram matrizes, 12 dias depois era realizado diagnóstico de gestação (Figura 4). Nos casos das doadoras, oito dias (D8) após a IA era feita lavagem uterina para retirada do embrião. Nestas situações, era necessária a sincronização com a receptora.

Para realizar a sincronização da doadora com a receptora, é preciso que as receptoras sejam monitoradas da mesma forma que as doadoras. O ideal é que no D8 da doadora, a receptora esteja num D4 ou D5. A indução da receptora era feita no dia seguinte da ovulação da doadora ou dois dias depois; para isso, a égua deveria ter edema igual ou maior que três (escala de zero a cinco) e folículo de 30 mm ou mais.

Caso não haja doadora disponível, pode-se mimetizar o estro de forma farmacológica, possibilitando que a receptora esteja apta a receber uma prenhez. Utilizava-se o protocolo: 1 ml de estradiol num dia; no segundo, utiliza-se 2ml; no terceiro dia aplica-se 1ml; no quarto dia utilizava-se 5ml de progesterona. Após três dias da aplicação da P4, a égua estava apta a receber embrião. Esse protocolo tem um porém: as éguas devem receber doses de 5ml de progesterona semanais até 90 dias de gestação, pois nesse período o CL é o responsável pela produção de progesterona, depois a placenta começa a produzir.



Figura 4 - Avaliação ultrassonográfica de útero gravídico com aproximadamente 12 dias (seta).

No dia da transferência, as receptoras são monitoradas por via ultrassonográfica, para avaliar a qualidade da tonicidade uterina, se há líquido no interior do útero, edema no endométrio. A receptora que tinha a melhor qualidade

uterina era escolhida para receber o embrião. Quatro dias depois, quando o embrião estava num D12, era realizada outra ultrassonografia para avaliar se havia prenhez ou se o embrião tinha se perdido.

A coleta do embrião era feita com sonda transcervical na doadora e lavagem uterina de 5 a 8 vezes. Após a lavagem era feita procura dos embriões com auxílio de lupa e, então, eles eram lavados em meio de manutenção por aproximadamente 6 vezes (Figura 5). Após esta etapa, os embriões eram colocados no inovulador e inovulados na receptora.

Outra atividade rotineira era a coleta de sêmen dos garanhões. A coleta de sêmen permite que mais de uma égua seja fecundada por um garanhão no mesmo dia, maximizando o uso do macho, e também permitindo que o sêmen seja enviado para outras propriedades. A coleta era realizada com vagina artificial modelo Botucatu e com uma égua no cio devidamente contida. O sêmen era avaliado em relação a motilidade e vigor, via microscópio. Para envio de sêmen, era realizada contagem dos espermatozóides e o sêmen era colocado na caixa de envio e lacrado.



Figura 5 – Placas de Petri contendo embriões prontos para lavagem

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIXETA, E. S; FAGUNDES, N. S; CAIXETA, M. S; PYLES, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino - revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, Lisboa, n. 103, p.25-34, 2008.

CARVENALE, E. M. Vitrification of equine embryos. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. Colorado, v.22, n.3, p.831–84, 2006.

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p.149-159, 2010.

DE LAVOR, J. **Avaliação de receptoras para transferência de embrião em equinos**. 2014. 53 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

DE LAVOR, J; ALONSO, M.A.; PIVATO, I.; OLIVEIRA, R.A.; Avaliação de receptoras para transferência de embrião em equinos. **Brazilian Journal of Equine Medicine** , v.54, p. 18-26, 2014.

GEARHART, R.O. **The Effect of Embryo Biopsy and Vitrification on the Development Potential of Equine Embryos**. 2009. 52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculty Of California Polytechnic State University, Faculty Of California, California.

GREEN, R. E., **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**. 2005. 21 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: editora Manole, 2004, 513p.

HUHTINEN, M.; PEIPPO, J.; BREDBACKA, P. Successful transfer of biopsied equine embryos. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p.361-367, 1997.

MOUSSA, M; BERSINGER, I; DOLIGEZ, P; GUIGNOT, F; DUCHAMP, G; VIDAMENT, M; MERMILLOD, P; BRUYAS, J. F. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p.1619-1632, 2005.

MOYA-ARAUJO, C.F.; ARAUJO, G.H. M.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p.58-66, 2010.

NICACIO, A. C. **Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro**. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OBERSTEIN, N; O'DONOVAN, M. K; BRUMMER, J. E; SEIDEL JR, G. E; CARVENALE, E. M; SQUIRES, E. L. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p.607 – 613, 2001.

OLIVEIRA, R. A, Criopreservação de sêmen equino, um desafio a ser vencido. **Pubvet**, Londrina, v.7, n. 26, p. 2678-2755, 2013.

RAJAN, R; MATSUMURA, K. Development and application of cryoprotectants. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, Singapore, p. 339 – 354, 2018.

SANCHEZ, R; BLANCO. M; WEISS. J; ROSATI. I; HERRERA. C; BOLLWEIN. H; BURGER. D; SIEME. H. Influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p.54-59, 2017.

SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreservação de embriões - metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, Pelotas, v.16, n.4, p.561 - 574, 2009.

SANTOS, P. B. E. S. S; BRANDI, R. A; GAMEIRO, A. H. Estudo do mercado e produção do cavalo brasileiro de hipismo no estado de São Paulo. **Pubvet**, Londrina, v. 12, n. 2, p.1-11, 2018.

SQUIRES, E.L. Breakthroughs in equine embryo cryopreservation. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice**, Lexington , v. 32, n. 3, p.415-424. 2016.